

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) **K 2675**

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Multivalente Antikörper-Konstrukte

Diese Unterlagen stellen die Bestätigung einer durch Telekopie (Telefax) eingereichten Anmeldung dar.

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

**Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
D - 69120 Heidelberg**

Datum der Übermittlung der Telekopie (Telefax): **5. Mai 1999**

Name der Behörde, bei der die Telekopie (Telefax) eingereicht worden ist: **DPA**

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

**LITTLE Melvyn
Fritz-von-Briesen-Str. 10
D - 69151 Neckargemünd**

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

GB

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

**HUBER Dr. Bernard
Patentanwälte Huber & Schüssler
Truderinger Str. 246
81825 München**

Telefonnr.:

49 89 / 4272 4748

Telefaxnr.:

49 89 / 4272 4749

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KIPRIYANOV Sergej
Furtwänglerstr. 3
D - 69121 Heidelberg

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

RU

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG DER VERTRAGSSTAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen: *wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden*):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GN Guinea | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input checked="" type="checkbox"/> Indien |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> Grenada |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia | |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSCHEIN		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsanscheine sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 5. 5. 1998	198 19 846.9	Deutschland		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA / EPA

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 4
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 15
Ansprüche : 3
Zusammenfassung : 1
Zeichnungen : 10
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 18
Blattzahl insgesamt : 51

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
2. ☐ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
3. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
4. ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
5. ☐ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
6. ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
7. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
8. ☒ Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
9. ☒ Sonstige (einzeln auflisten): **Scheck (mit Originalunterlagen)**

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.): 1

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: **Kopie für Prio-Beleg**

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Dr. Bernard Huber

München, 5. Mai 1999

Patentanwalt

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anhang zum Antrag

Von Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Aktenzeichen des Anmelders
oder Anwalts

K 2675

Eingangsstempel des Anmeldeamts

Anmelder

Deutsches Krebsforschungszentrum

BERECHNUNG DER VORGESCHRIEBENEN GEBÜHREN

1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR 150,00 T

2. RECHERCHENGEBÜHR 2.198,35 S

Die internationale Recherche ist durchzuführen von _____
 (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig,
 ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)

3. INTERNATIONALE GEBÜHR

Grundgebühr

Die internationale Anmeldung enthält 51 Blätter.

umfaßt die ersten 30 Blätter

21

x

19,00

=

800,00

b1

399,00

b2

Anzahl der Blätter
über 30

Zusatzblattgebühr

Addieren Sie die in Feld b1 und b2 eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld B ein

1.199,00 B

Bestimmungsgebühren

Die internationale Anmeldung enthält alle Bestimmungen.

10

x

184,00

=

1.840,00

D

Anzahl der zu zahlenden

Bestimmungsgebühren

Bestimmungsgebühren (maximal 11)

Addieren Sie die in Feld B und D eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein
 (Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der internationalen Gebühr um 75%.
 Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I einzutragende
 Gesamtbetrag 25% der Summe der in Feld B und D eingetragenen Beträge.)

3.039,00

I

35,00

P

4. GEBÜHR FÜR PRIORITÄTSBELEG (ggf.)

5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN

Addieren Sie die in Feldern T, S, I und P eingetragenen Beträge,
und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein

5.422,35

INSGESAMT

☐ Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.

ZAHLUNGSWEISE

☐ Abbuchungsauftrag (siehe unten)☐ Bankwechsel☐ Kupons☒ Scheck Nr. 312765077☐ Barzahlung☐ Sonstige (einzeln angeben):☐ Postanweisung☐ Gebührenmarken

ABBUCHUNGSAUFTRAG (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

- Das Anmeldeamt/ _____ ☐ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.
- ☐ wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.
- ☐ wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift

Anmelderin: Deutsches Krebsforschungszentrum
Unser Zeichen: K 2675

Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_v -Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H - und zwei V_L -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H - und einer V_L -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_v -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_v -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke

einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_v -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10 - 30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit anderen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d.h. multivalentes, F_v -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_v -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck " F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_v -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzel-

kettigen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_v -Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_v -Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d.h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d.h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0 - 10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH_2 -Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3 - 10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11 - 20 Aminosäuren, insbesondere 15 - 20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz $(G_4S)_4$, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1 - 6 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke " F_v -Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL, pPIC-DISC-SL, pDISC5-LL und pDISC6-SL. Die ersteren vier wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F_v -Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden.

Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt /ac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β -

Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt *lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des

Saccharomyces cerevisiae- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 9 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC5-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Repressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α -Peptid von β -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein $(Gly_4Ser)_4$ -Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 10 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC6-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Re-

pressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α -Peptid von β -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v -Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG- α CD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente kodieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v -Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCA-CACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit *EcoRI* und *EcoRV* gespalten und mit dem mit *EcoRI/EcoRV* linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L -Domäne von Anti-CD19,

gefolgt von einem Segment, das für ein *c-myc*-Epitop und einen Hexahistidinschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCACACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCA, und DP4, 5'-AGCACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGAGTTTAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit *Hind*III und *Xba*I gespalten und mit dem durch *Hind*III/*Xba*I linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-T A C T G C A G C T G C A C C T G G C T A C C A C C A C - CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCCAGAACCACCACCACAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly₄Ser)₄-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des *Ncd*/*Pvu*II-Restriktionsfragments aus pHOG19-3, umfassend das Vektorgerüst und die *Ncd*/*Pvu*II-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte sind in den Figuren 5 bzw. 6 angegeben.

Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevi-*

siae α -Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, ZeocinTM, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAAT-TCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXBn 5'-GGTC-GACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit *Eco*RI und *Xba*I gespalten und in mit *Eco*RI/*Xba*I linearisiertes pPICZ α A ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZ α A (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZ α A wurde mit *Eco*RI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit *Xba*I gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit *Nco*I gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit *Xba*I wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F_v-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli/XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden

über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2xYT_{GA} wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu²⁺ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976,

Anal. Biochem., 72, 248-254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A₂₈₀-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{1\text{mg/ml}} = 1,96$ bzw. 1,93 bestimmt.

Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 μg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit *Sad* linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 $\mu\text{g/ml}$ ZeocinTM enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-*myc*-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das

Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 μ l/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3⁺/CD19⁻-akute-T-Zell-Leukämie-Linie Jurkat und die CD19⁺/CD3⁻-B-Zell-Linie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5×10^5 Zellen in 50 μ l RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 μ l der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 μ l 10 μ g/ml anti-c-*myc*-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 μ l des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 μ l 1 μ g/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zell-Linie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard [⁵¹Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2×10^6 Zielzellen wurden mit 200 μ Ci

Na[⁵¹Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2×10^5 /ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5×10^6 /ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 μ l wurden auf 10^4 Zielzellen/Vertiefung in 50 μ l titriert. 50 μ l Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 μ l des Überstands wurden gewonnen und auf [⁵¹Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung - spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung - spontane Freisetzung) x 100.

Beispiel 6: Konstruktion der Plasmide pDISC5-LL und pDISC6-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien durch Hoch-Zelldichte-Fermentation

Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, die das hok/sok Plasmid-freie Zell-"suicide"-System und ein Gen enthielten, das für den Skp/OmpH periplasmatischen Faktor für eine größere Herstellung rekombinanter Antikörper kodiert. Das skp Gen wurde durch PCR mittels der Primer skp-1, 5'-CGA ATT CTT AAG ATA AGA AGG AGT TTA TTG TGA AAA AGT GGT TAT TAG CTG CAG G und skp-2, 5'-CGA ATT AAG CTT CAT TAT TTA ACC TGT TTC AGT ACG TCG G unter Verwendung des Plasmids pGAH317 (Holck and Kleppe, 1988, Gene 67, 117-124) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit AflIII und HindIII gespalten und in das mit AflIII/HindIII linearisierte Plasmid pHKK (Horn et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 524-532) inseriert, wodurch der Vektor pSKK erhalten wurde. Die in den Plasmiden pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL enthaltenen und für die scFv-Antikörper-Konstrukte kodierenden Gene wurden durch PCR mittels der Primer fe-

1, 5'-CGA ATT TCT AGA TAA GAA GGA GAA ATT AAC CAT GAA ATA CC und fe-
2, 5'-CGA ATT CTT AAG CTA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TGA G
amplifiziert. Die XbaI/AflII gespaltenen PCR-Fragmente wurden in pSKK vor dem
skp Insert inseriert, wodurch die Expressionsplasmide pDISC5-LL bzw. pDISC6-SL
5 erhalten wurden, die tri-cistronische Operons unter der Kontrolle des lac
Promotor/Operator-Systems enthalten (vgl. Fig. 9, 10).

K 2675

Patentansprüche

- 5 1. Multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
2. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0 -
10 Aminosäuren aufweisen.
3. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
4. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Anti-
15 körper-Konstrukt bivalent ist.
5. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11-20 Aminosäuren aufweist.
- 20 6. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G₄S)₄ aufweist.
7. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Anti-
körper-Konstrukt tetravalent ist.
- 25 8. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3-10 Aminosäuren aufweist.
9. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2
30 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

10. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
- 5 11. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem
15 Expressionsplasmid exprimiert wird.
14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
- 20 15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-LL.
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-SL.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
25
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL.
19. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC5-LL.
- 30 20. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC6-SL.

21. Verwendung des multivalenten F_v -Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.

K 2675

Zusammenfassung

5

Multivalente Antikörper-Konstrukte

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v -Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v -Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Multivalente Antikörper-Konstrukte

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1698 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 28..1689

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 28..1689

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala
 1 5

GCC	GCT	GGC	TTG	CTG	CTG	CTG	GCA	GCT	CAG	CCG	GCC	ATG	GCG	CAG	GTG	99
Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	
	10					15					20					
CAA	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAA	CTG	GCA	AGA	CCT	GGG	GCC	TCA	GTG	147
Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	
	25				30					35					40	
AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTT	ACT	AGG	TAC	ACG	ATG	195
Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	
				45					50					55		
CAC	TGG	GTA	AAA	CAG	AGG	CCT	GGA	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATT	GGA	TAC	243
His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	
			60					65					70			
ATT	AAT	CCT	AGC	CGT	GGT	TAT	ACT	AAT	TAC	AAT	CAG	AAG	TTC	AAG	GAC	291
Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	
		75					80					85				
AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	ACA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAA	339
Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	
	90					95					100					
CTG	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCA	GTC	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	387
Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	
105					110					115					120	
TAT	TAT	GAT	GAT	CAT	TAC	AGC	CTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT	435
Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	
				125					130					135		
CTC	ACA	GTC	TCC	TCA	GCC	AAA	ACA	ACA	CCC	AAG	CTT	GGC	GGT	GAT	ATC	483
Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	
			140					145					150			
TTG	CTC	ACC	CAA	ACT	CCA	GCT	TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	CAG	AGG	531
Leu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	
		155				160						165				
GCC	ACC	ATC	TCC	TGC	AAG	GCC	AGC	CAA	AGT	GTT	GAT	TAT	GAT	GGT	GAT	579
Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	
	170					175					180					
AGT	TAT	TTG	AAC	TGG	TAC	CAA	CAG	ATT	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	627
Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	
185					190					195					200	
CTC	ATC	TAT	GAT	GCA	TCC	AAT	CTA	GTT	TCT	GGG	ATC	CCA	CCC	AGG	TTT	675
Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	
				205					210					215		
AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT	GTG	723
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	
			220					225					230			

GAG Glu	AAG Lys	GTG Val 235	GAT Asp	GCT Ala	GCA Ala	ACC Thr	TAT Tyr 240	CAC His	TGT Cys	CAG Gln	CAA Gln	AGT Ser 245	ACT Thr	GAG Glu	GAT Asp	771
CCG Pro	TGG Trp 250	ACG Thr	TTC Phe	GGT Gly	GGA Gly	GGC Gly 255	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	GAA Glu	ATC Ile 260	AAA Lys	CGG Arg	GCT Ala	GAT Asp	819
GCT Ala 265	CGC Ala	GCC Ala	GCT Ala	GGT Gly	GGT Gly 270	GGT Gly	GGT Gly	TCT Ser	GGC Gly	GGC Gly 275	GGT Gly	GGT Gly	AGC Ser	GGT Gly	GGT Gly 280	867
GGC Gly	GGC Gly	TCC Ser	GGT Gly	GGT Gly 285	GGT Gly	GGT Gly	AGC Ser	CAG Gln	GTG Val 290	CAG Gln	CTG Leu	CAG Gln	CAG Gln	TCT Ser	GGG Gly 295	915
GCT Ala	GAG Glu	CTG Leu 300	GTG Val 300	AGG Arg	CCT Pro	GGG Gly	TCC Ser	TCA Ser 305	GTG Val	AAG Lys	ATT Ile	TCC Ser	TGC Cys 310	AAG Lys	GCT Ala	963
TCT Ser	GGC Gly	TAT Tyr 315	GCA Ala	TTC Phe	AGT Ser	AGC Ser	TAC Tyr 320	TGG Trp	ATG Met	AAC Asn	TGG Trp	GTG Val 325	AAG Lys	CAG Gln	AGG Arg	1011
CCT Pro 330	GGA Gly	CAG Gln	GGT Gly	CTT Leu	GAG Glu	TGG Trp 335	ATT Ile	GGA Gly	CAG Gln	ATT Ile	TGG Trp 340	CCT Pro	GGA Gly	GAT Asp	GGT Gly	1059
GAT Asp 345	ACT Thr	AAC Asn	TAC Tyr	AAT Asn	GGA Gly 350	AAG Lys	TTC Phe	AAG Lys	GGT Gly	AAA Lys 355	GCC Ala	ACT Thr	CTG Leu	ACT Thr	GCA Ala 360	1107
GAC Asp	GAA Glu	TCC Ser	TCC Ser	AGC Ser 365	ACA Thr	GCC Ala	TAC Tyr	ATG Met	CAA Gln 370	CTC Leu	AGC Ser	AGC Ser	CTA Leu	GCA Ala 375	TCT Ser	1155
GAG Glu	GAC Asp	TCT Ser	CGC Ala 380	GTC Val	TAT Tyr	TTC Phe	TGT Cys	GCA Ala 385	AGA Arg	CGG Arg	GAG Glu	ACT Thr	ACG Thr 390	ACG Thr	GTA Val	1203
GGC Gly	CGT Arg	TAT Tyr 395	TAC Tyr	TAT Tyr	GCT Ala	ATG Met	GAC Asp 400	TAC Tyr	TGG Trp	GGT Gly	CAA Gln	GGA Gly 405	ACC Thr	TCA Ser	GTC Val	1251
ACC Thr 410	GTC Val	TCC Ser	TCA Ser	GCC Ala	AAA Lys	ACA Thr 415	ACA Thr	CCC Pro	AAG Lys	CTT Leu	GGC Gly 420	GGT Gly	GAT Asp	ATC Ile	GTG Val	1299
CTC Leu 425	ACT Thr	CAG Gln	TCT Ser	CCA Pro	GCA Ala 430	ATC Ile	ATG Met	TCT Ser	GCA Ala	TCT Ser 435	CCA Pro	GGG Gly	GAG Glu	AAG Lys	GTC Val 440	1347
ACC Thr	ATG Met	ACC Thr	TGC Cys	AGT Ser 445	GCC Ala	AGC Ser	TCA Ser	AGT Ser	GTA Val 450	AGT Ser	TAC Tyr	ATG Met	AAC Asn	TGG Trp 455	TAC Tyr	1395

CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC	1443
Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser	
460 465 470	
AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT GGG	1491
Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly	
475 480 485	
ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC	1539
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala	
490 495 500	
ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG	1587
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser	
505 510 515 520	
GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA TCC	1635
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser	
525 530 535	
GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT CAC	1683
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His	
540 545 550	
CAT CAC TAATCTAGA	1698
His His	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 554 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
1 5 10 15	
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu	
20 25 30	
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
35 40 45	
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly	
50 55 60	
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr	
65 70 75 80	

Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys
				85					90					95	
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
			100					105					110		
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu
		115					120					125			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
	130					135					140				
Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser
145					150					155					160
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
				165					170					175	
Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln
			180					185					190		
Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu
		195					200					205			
Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
		210				215					220				
Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr
225					230					235					240
His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
				245					250					255	
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly
			260					265					270		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
		275					280					285			
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser
		290				295					300				
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr
305					310					315					320
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				325					330					335	
Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
			340					345					350		
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
		355					360					365			

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 370 375 380
 Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 385 390 395 400
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
 420 425 430
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser
 435 440 445
 Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
 450 455 460
 Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
 465 470 475 480
 His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 485 490 495
 Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 500 505 510
 Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
 515 520 525
 Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 530 535 540
 Asp Leu Asn Ser His His His His His His
 545 550

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1653 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 28..1644

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:28..1644

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA	51
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala	
1 5	
GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG	99
Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val	
10 15 20	
CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG	147
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val	
25 30 35 40	
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG	195
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met	
45 50 55	
CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC	243
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr	
60 65 70	
ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC	291
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp	
75 80 85	
AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA	339
Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln	
90 95 100	
CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA	387
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
105 110 115 120	
TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT	435
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
125 130 135	
CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC	483
Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile	
140 145 150	
TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG	531
Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg	
155 160 165	
GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT	579
Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp	
170 175 180	

AGT Ser 185	TAT Tyr	TTG Leu	AAC Asn	TGG Trp	TAC Tyr 190	CAA Gln	CAG Gln	ATT Ile	CCA Pro	GGA Gly 195	CAG Gln	CCA Pro	CCC Pro	AAA Lys	CTC Leu 200	627
CTC Leu	ATC Ile	TAT Tyr	GAT Asp	GCA Ala 205	TCC Ser	AAT Asn	CTA Leu	GTT Val	TCT Ser 210	GGG Gly	ATC Ile	CCA Pro	CCC Pro	AGG Arg 215	TTT Phe	675
AGT Ser	GGC Gly	AGT Ser	GGG Gly 220	TCT Ser	GGG Gly	ACA Thr	GAC Asp	TTC Phe 225	ACC Thr	CTC Leu	AAC Asn	ATC Ile	CAT His 230	CCT Pro	GTG Val	723
GAG Glu	AAG Lys	GTG Val 235	GAT Asp	GCT Ala	GCA Ala	ACC Thr	TAT Tyr 240	CAC His	TGT Cys	CAG Gln	CAA Gln	AGT Ser 245	ACT Thr	GAG Glu	GAT Asp	771
CCG Pro 250	TGG Trp	ACG Thr	TTC Phe	GGT Gly	GGA Gly	GGC Gly 255	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	GAA Glu	ATC Ile 260	AAA Lys	CGG Arg	GCT Ala	GAT Asp	819
GCT Ala 265	GCG Ala	GCC Ala	GCT Ala	GGT Gly	GGC Gly 270	CCA Pro	GGG Gly	TCG Ser	CAG Gln	GTG Val 275	CAG Gln	CTG Leu	CAG Gln	CAG Gln	TCT Ser 280	867
GGG Gly	GCT Ala	GAG Glu	CTG Leu	GTG Val 285	AGG Arg	CCT Pro	GGG Gly	TCC Ser	TCA Ser 290	GTG Val	AAG Lys	ATT Ile	TCC Ser	TGC Cys 295	AAG Lys	915
GCT Ala	TCT Ser	GGC Gly	TAT Tyr 300	GCA Ala	TTC Phe	AGT Ser	AGC Ser	TAC Tyr 305	TGG Trp	ATG Met	AAC Asn	TGG Trp	GTG Val 310	AAG Lys	CAG Gln	963
AGG Arg	CCT Pro	GGA Gly 315	CAG Gln	GGT Gly	CTT Leu	GAG Glu	TGG Trp 320	ATT Ile	GGA Gly	CAG Gln	ATT Ile	TGG Trp 325	CCT Pro	GGA Gly	GAT Asp	1011
GGT Gly 330	GAT Asp	ACT Thr	AAC Asn	TAC Tyr	AAT Asn	GGA Gly 335	AAG Lys	TTC Phe	AAG Lys	GGT Gly	AAA Lys 340	GCC Ala	ACT Thr	CTG Leu	ACT Thr	1059
GCA Ala 345	GAC Asp	GAA Glu	TCC Ser	TCC Ser	AGC Ser 350	ACA Thr	GCC Ala	TAC Tyr	ATG Met	CAA Gln 355	CTC Leu	AGC Ser	AGC Ser	CTA Leu	GCA Ala 360	1107
TCT Ser	GAG Glu	GAC Asp	TCT Ser	GCG Ala 365	GTC Val	TAT Tyr	TTC Phe	TGT Cys	GCA Ala 370	AGA Arg	CGG Arg	GAG Glu	ACT Thr	ACG Thr	ACG Thr	1155
GTA Val	GGC Gly	CGT Arg	TAT Tyr 380	TAC Tyr	TAT Tyr	GCT Ala	ATG Met	GAC Asp 385	TAC Tyr	TGG Trp	GGT Gly	CAA Gln	GGA Gly 390	ACC Thr	TCA Ser	1203
GTC Val	ACC Thr	GTC Val 395	TCC Ser	TCA Ser	GCC Ala	AAA Lys	ACA Thr 400	ACA Thr	CCC Pro	AAG Lys	CTT Leu	GGC Gly 405	GGT Gly	GAT Asp	ATC Ile	1251

GTG	CTC	ACT	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	1299
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	
410						415					420					
GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	AAC	TGG	1347
Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	
425					430					435					440	
TAC	CAG	CAG	AAG	TCA	GGC	ACC	TCC	CCC	AAA	AGA	TGG	ATT	TAT	GAC	ACA	1395
Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	
			445						450					455		
TCC	AAA	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GCT	CAC	TTC	AGG	GGC	AGT	GGG	TCT	1443
Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	
		460					465						470			
GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC	GGC	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	1491
Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	
	475						480				485					
GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG	AGT	AGT	AAC	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	1539
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	
490						495					500					
TCG	GGG	ACA	AAG	TTG	GAA	ATA	AAC	CGG	GCT	GAT	ACT	GCA	CCA	ACT	GGA	1587
Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn	Arg	Ala	Asp	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	
505					510					515					520	
TCC	GAA	CAA	AAG	CTG	ATC	TCA	GAA	GAA	GAC	CTA	AAC	TCA	CAT	CAC	CAT	1635
Ser	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	His	His	His	
			525						530					535		
CAC	CAT	CAC	TAATCTAGA												1653	
His	His	His														

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 539 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 50 55 60
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
 65 70 75 80
 Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
 85 90 95
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 100 105 110
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 130 135 140
 Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser
 145 150 155 160
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 165 170 175
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190
 Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
 195 200 205
 Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220
 Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly
 260 265 270
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 275 280 285
 Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser
 290 295 300
 Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 305 310 315 320
 Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
 325 330 335

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
 340 345 350
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 355 360 365
 Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met
 370 375 380
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 405 410 415
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 420 425 430
 Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 435 440 445
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 450 455 460
 Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 465 470 475 480
 Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 485 490 495
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 500 505 510
 Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 515 520 525
 Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His
 530 535

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TATATACTGC AGCTGCACCT GCGACCCTGG GCCACCAGCG GCCGCAGCAT CAGCCCCG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCGTGAATTC CAGGTGCAAC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAA CTGGC

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGTCGACGTT AACCGACAAA CAACAGATAA AACG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 348 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..348

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:1..348

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC	48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	
1 5 10 15	
GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA	96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	
20 25 30	
ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC	144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
35 40 45	
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG	192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	
50 55 60	
TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA	240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	
65 70 75 80	
TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC CAG GTG CAA CTG CAG	288
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln	
85 90 95	
CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC	336
Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser	
100 105 110	
TGC AAG GCT TCT	348
Cys Lys Ala Ser	
115	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 116 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1           5           10           15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
          20           25           30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
      35           40           45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
      50           55           60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
      65           70           75           80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln
          85           90           95
Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
      100           105           110
Cys Lys Ala Ser
      115

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 354 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1..354

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:1..354

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ATG	AGA	TTT	CCT	TCA	ATT	TTT	ACT	GCT	GTT	TTA	TTC	GCA	GCA	TCC	TCC	48
Met	Arg	Phe	Pro	Ser	Ile	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	
1				5					10					15		
GCA	TTA	GCT	GCT	CCA	GTC	AAC	ACT	ACA	ACA	GAA	GAT	GAA	ACG	GCA	CAA	96
Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Ala	Gln	
			20					25					30			
ATT	CCG	GCT	GAA	GCT	GTC	ATC	GGT	TAC	TCA	GAT	TTA	GAA	GGG	GAT	TTC-	144
Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe	
		35					40					45				
GAT	GTT	GCT	GTT	TTG	CCA	TTT	TCC	AAC	AGC	ACA	AAT	AAC	GGG	TTA	TTG	192
Asp	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	
	50					55					60					
TTT	ATA	AAT	ACT	ACT	ATT	GCC	AGC	ATT	GCT	GCT	AAA	GAA	GAA	GGG	GTA	240
Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	
65					70				75						80	
TCT	CTC	GAG	AAA	AGA	GAG	GCT	GAA	GCT	GAA	TTC	ATG	GCG	CAG	GTG	CAA	288
Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Phe	Met	Ala	Gln	Val	Gln	
				85					90					95		
CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAA	CTG	GCA	AGA	CCT	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	336
Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	
			100					105					110			
ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT											354
Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser											
			115													

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 118 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met	Arg	Phe	Pro	Ser	Ile	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	
1				5					10					15		
Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Ala	Gln	
			20					25					30			
Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe	
		35					40					45				

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln
 85 90 95
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 100 105 110
 Met Ser Cys Lys Ala Ser
 115

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TCACACAGAA TTCTTAGATC TATTAAAGAG GAGAAATTAA CC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AGCACACGAT ATCACCGCCA AGCTTGGGTG TTGTTTTGGC

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AGCACACAAG CTTGGCGGTG ATATCTTGCT CACCCAAACT CCA

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AGCACACTCT AGAGACACAC AGATCTTTAG TGATGGTGAT GGTGATGTGA GTTTAGG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT GCAACTGCAG CAG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 102 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

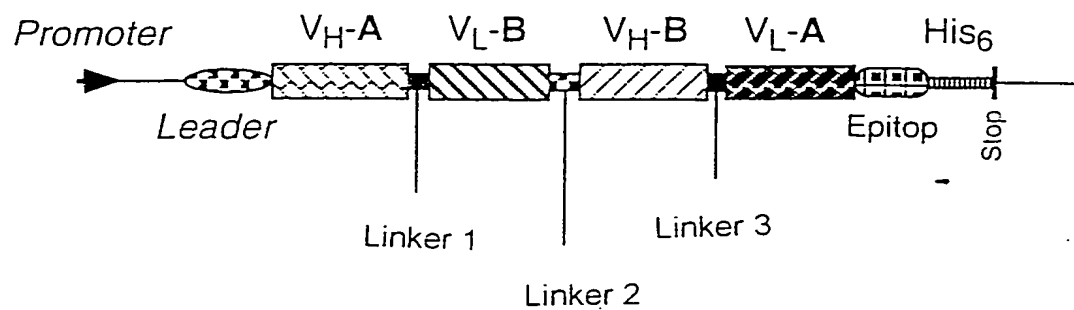
TATATACTGC AGCTGCACCT GGCTACCACC ACCACCGGAG CCGCCACCAC CGCTACCACC

60

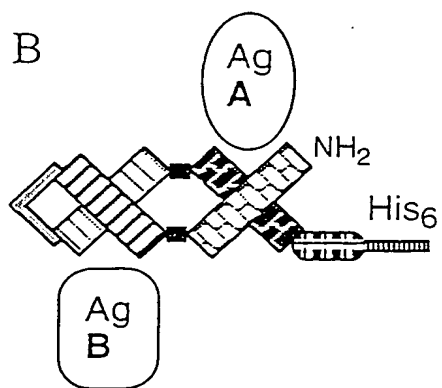
GCCGCCAGAA CCACCACCAC CAGCGGCCGC AGCATCAGCC CG

102

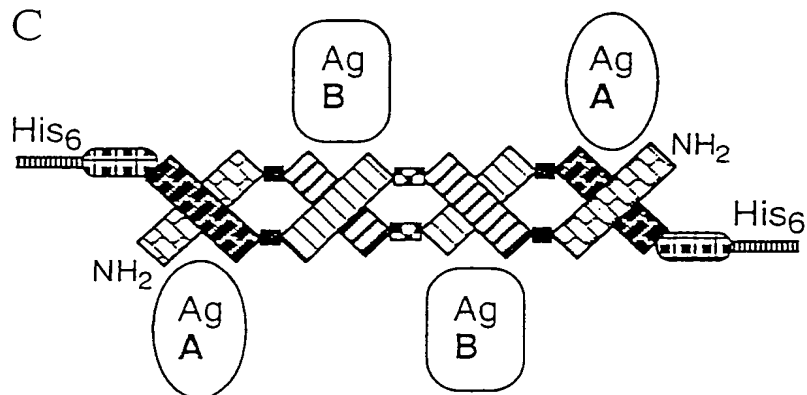
A



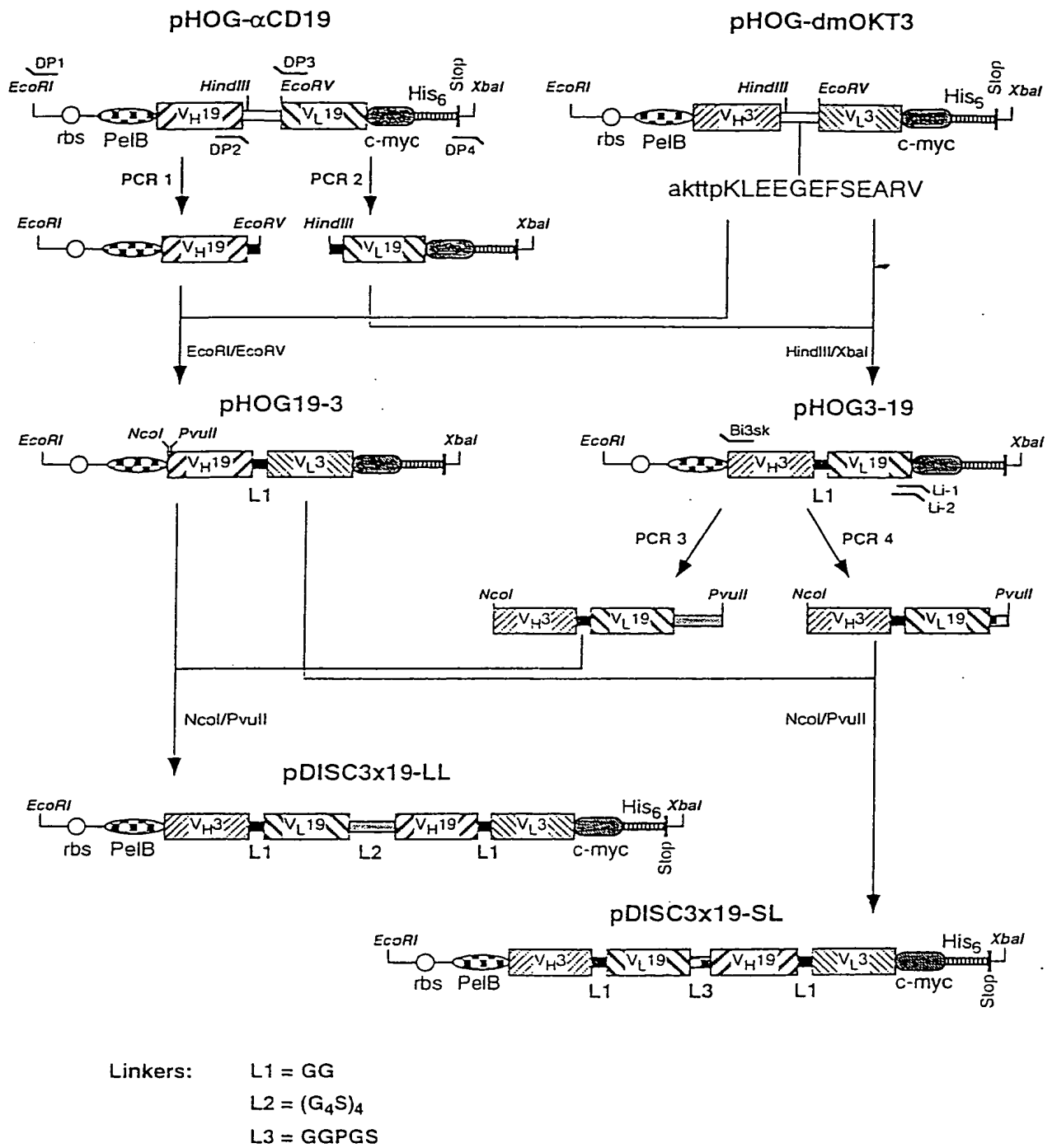
B



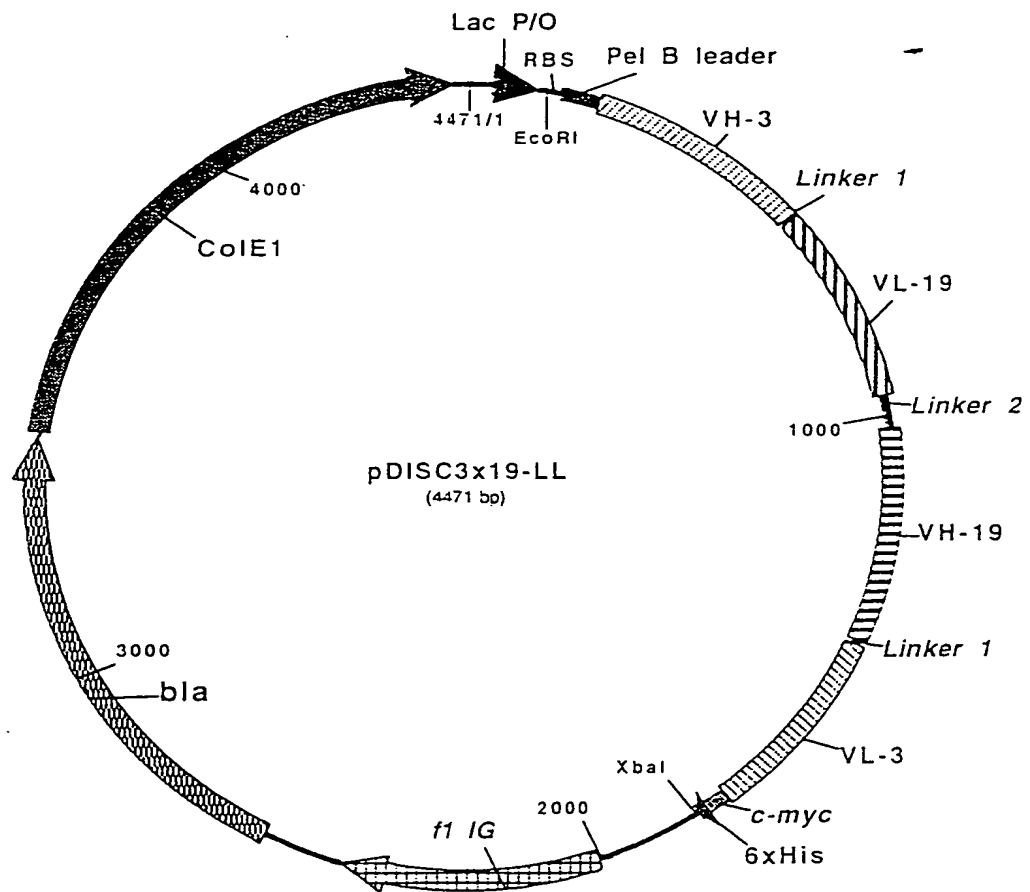
C



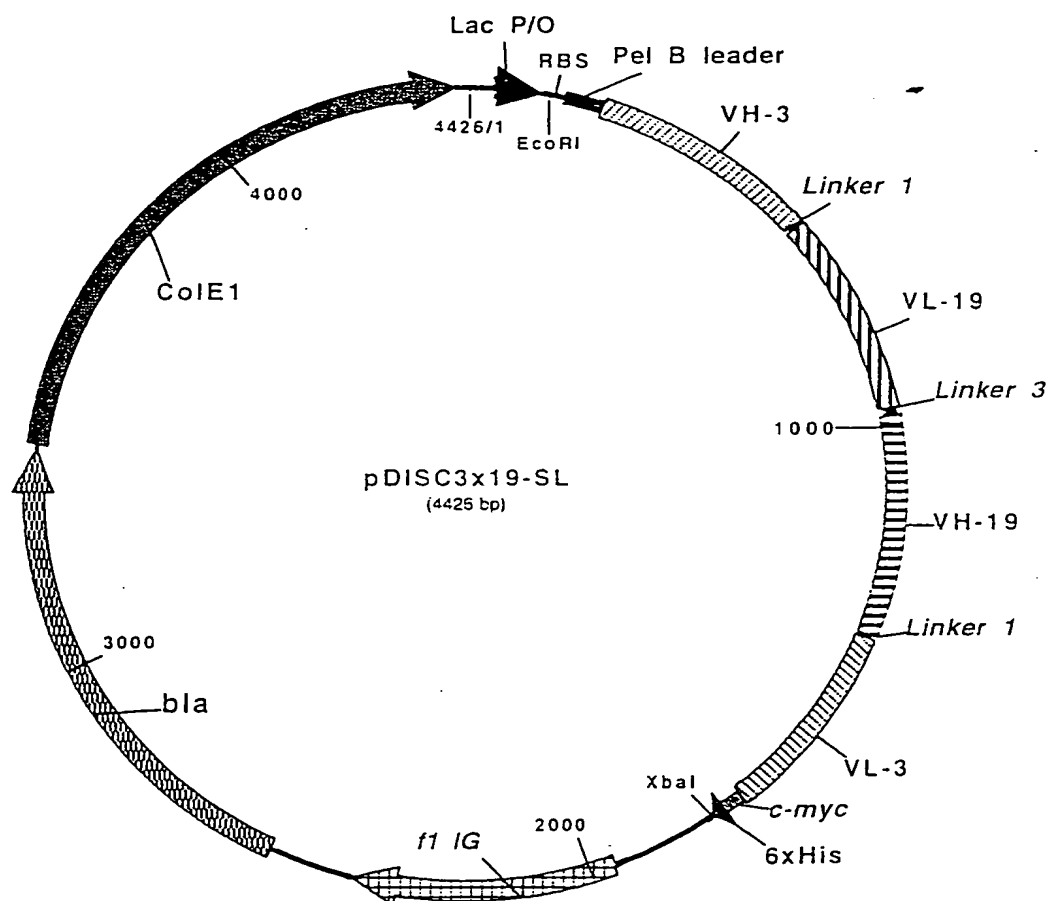
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

FIGUR 5

EcoRI RBS PelB leader NcoI

1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGGCTTACGGCAGCCGCTGGGCTTGGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCATGG

1) M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M

Frame-H1 VH anti-CD3

92 CGCAGGTGCACTGCAGCAGTCTCGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGGTACACCTTTAC

22) A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

183 TAGGTACACGATGGCACTGGGTAAACAGAGGCGCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC

52) R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S E G Y T

Frame-H3

267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAGGCGCATTGACTACAGACAAATCTCCAGCAGCAGCTACATGCACTGAGCAGCCTGAC

80) N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

354 ATCTGAGGACTCTGCACTCTATTACTCTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAGGCACTCTCTCA

109) S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19

440 CAGTCTCTCAAGCCAAACACCCAGCTTGGCGGTGATATCTTGGCTACCCAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTTAGGGCAGA

138) T V S S A K T T F K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L S Q

CDR-L1 Frame-L2

530 GGGCCACCATCTCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAAGTGGTACACAGATTCAGGAC

168) R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G

CDR-L2 Frame-L3

614 AGCCACCCAACTCTCTATCTATGATGCATCCAACTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT

196) Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

702 CACCTCAACATCCATCTCTGTCGAGAGGTGGATGCTGCACCTATCACTGTGACGAAAGTACTGAGGATCCGTCGACGTTCCGGTGA

225) T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1

790 GGCACCAAGCTGGAAATCAAAAGGCTGCTGGCGCCGCTGGTGGCCAGGGTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCT

255) G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L

VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2

879 GGTGAGGCTGGGTCTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGGCG

284) V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R

CDR-H2

968 CTGGACAGGCTCTTCACTGAGTGGATTGCAAGATTTGGCCTGGAGATGGTGATCTAATACTACAATGGAAGTTCAAGGGTAAAGCC

314) P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A

Frame-H3

1051 ACTCTGACTGCAGACGAATCTCTCAGCAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGAC

342) T L T A D E S S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R

CDR-H3 Frame-H4 CH1

1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCAAGCCAAA

372) R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K

Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3

1226 CAACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAACATGACCTGCA

400) T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C

CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2

1316 GTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAAGCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTATGACACATGCCAA

430) S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K

Frame-L3

1401 ACTGGCTTCTGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGC

458) L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A

CDR-L3 Frame-L4 C kappa

1491 TCCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACAGTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGGAATTAACCGGGCTGATCTGC

488) A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A

c-myc epitope His6 tail XbaI

1578 ACCAATCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAAGAGACCTAAACTCACTCCCTCCCTCCCTCACTAACTAGA

517) P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H

FIGUR 6

941 ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 CCTAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTC
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98▶ G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

941 ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
 1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCCATG
 25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
 50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

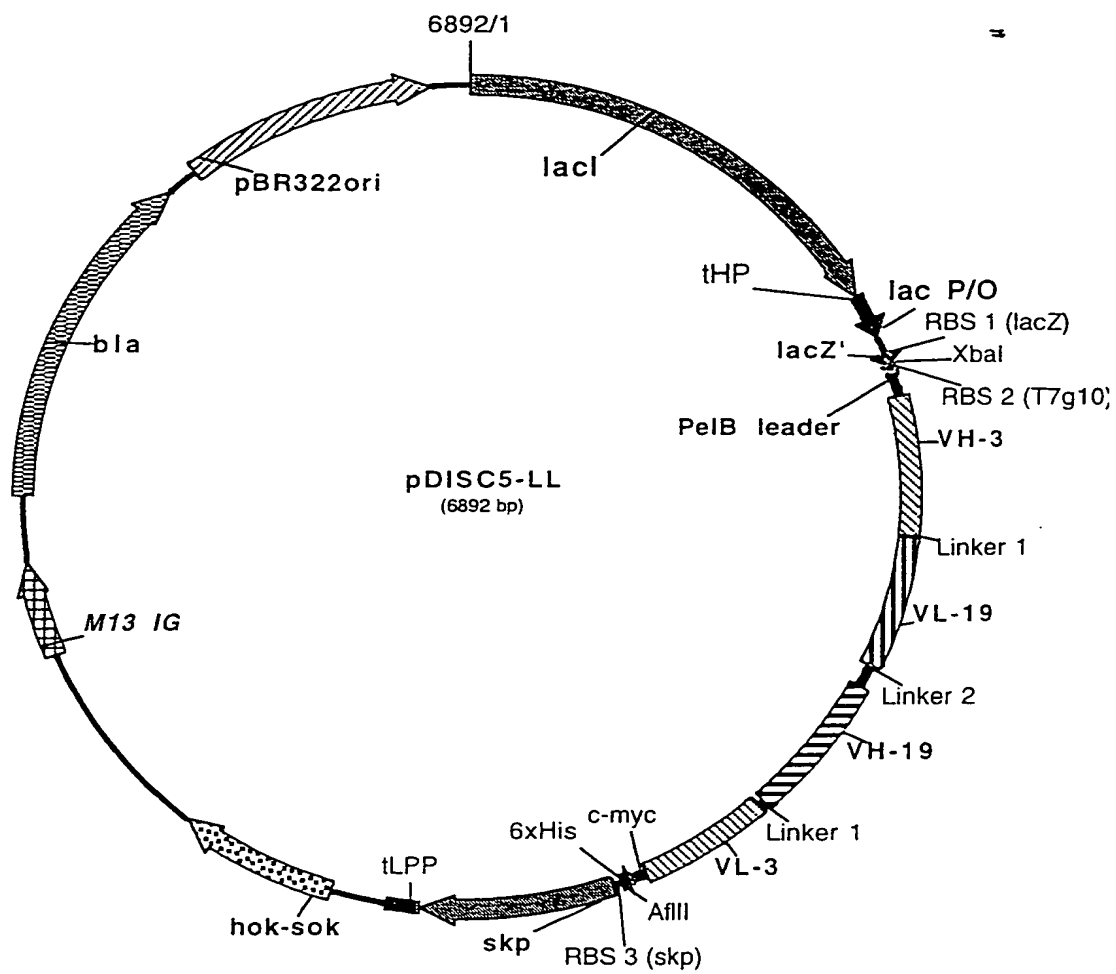
EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAGAGAGGCTGAAGCTGATTTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG
 75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

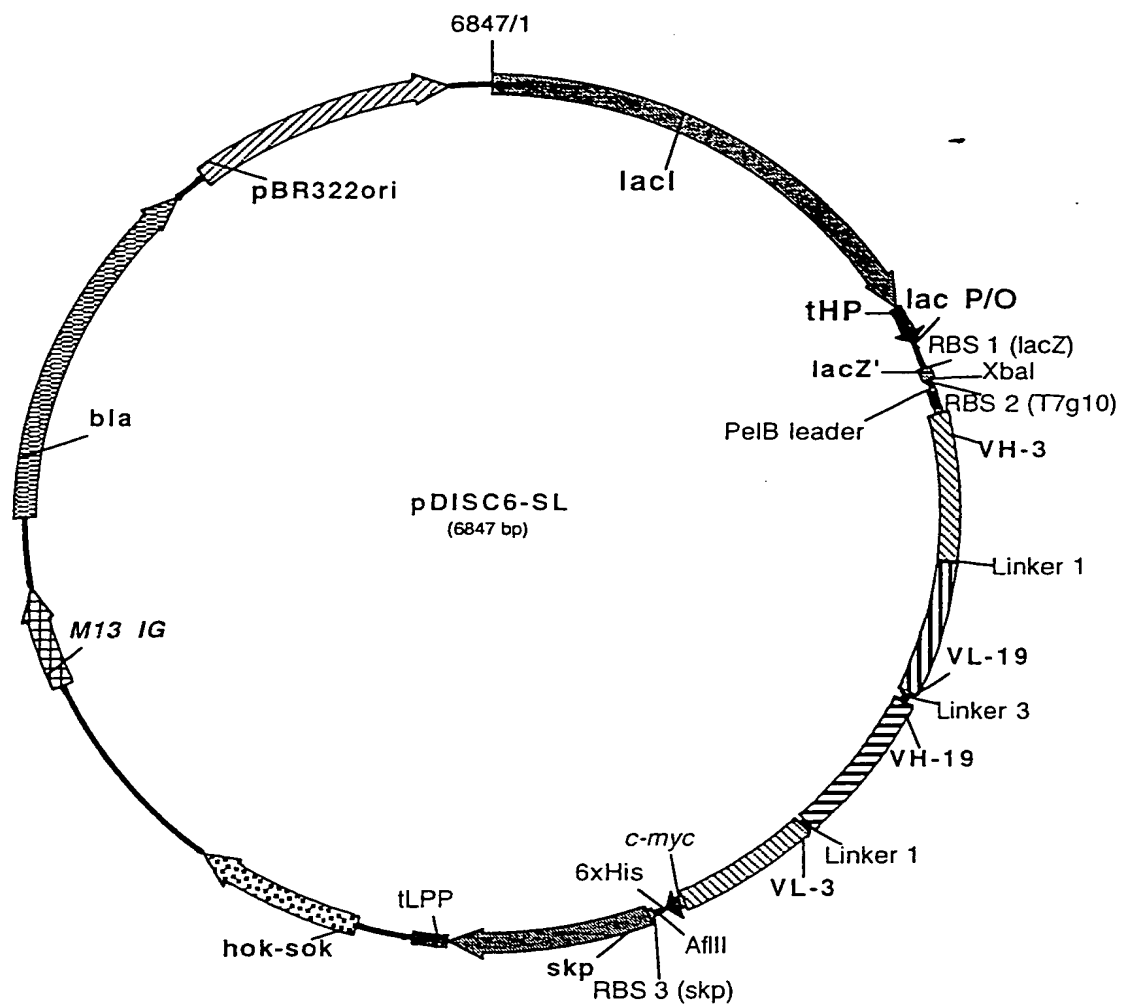
VH anti-CD3

1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
 99▶ Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8



FIGUR 9



FIGUR 10